

Aus der medizinischen Poliklinik der Universität Zürich
(Direktor: Prof. P. H. Rossier)
Arbeit unter Leitung von P.-D. Dr. O. Spühler

**Die chromatographische Trennung und Bestimmung
der 17-Ketosteroide im Urin
Methodik und klinisch-experimentelle Anwendung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät der Universität
Z Ü R I C H

Vorgelegt von
MAX MARTI
von Basel-Stadt

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. med. P. H. Rossier

Zürich 1950
Druck von Benno Schwabe & Co.
Basel



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der medizinischen Poliklinik der Universität Zürich
(Direktor: Prof. P. H. Rossier)
Arbeit unter Leitung von P.-D. Dr. O. Spühler

**Die chromatographische Trennung und Bestimmung
der 17-Ketosteroide im Urin
Methodik und klinisch-experimentelle Anwendung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät der Universität
Z Ü R I C H

Vorgelegt von
MAX MARTI
von Basel-Stadt

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. med. P. H. Rossier

Zürich 1950
Druck von Benno Schwabe & Co.
Basel

MEINEN ELTERN GEWIDMET



Erschienen in «Helvetica Medica Acta» Vol. 18, 1951, Fasc. 3

Einleitung

Nach der heutigen Auffassung sind die 17-Ketosteroide Abbauprodukte der eigentlichen Nebennierenrinden(NNR)- und Gonadensteroiden, obwohl gewisse biologisch-chemische Indizien dafür sprechen, daß sie auch für die Synthese gewisser Steroide in Frage kommen. Die im Urin ausgeschiedenen 17-Ketosteroide bilden in ihrer qualitativen und quantitativen Zusammensetzung ein Kriterium für die Funktion der NNR, der Gonaden und im weiteren Sinne auch der Hypophyse. Bei Änderung der hormonalen Tätigkeit dieser Organe finden wir im Urin eine Vermehrung oder Verminderung der Metaboliten der betreffenden Hormone. Die eigentliche Ursache kann im betreffenden Organ selbst oder in der ihm übergeordneten Hypophyse liegen. Bei normalem Abbauvermögen (das z. B. bei Schädigungen des Leberparenchyms gestört sein kann) gibt die 17-Ketosteroid-Ausscheidung ein zuverlässiges Bild der Steroidproduktion des Ursprungsorganes. Über den Steroidmetabolismus ist bereits mancherlei bekannt geworden, so daß wir die Muttersubstanz von verschiedenen 17-Ketosteroiden mit großer Wahrscheinlichkeit kennen. Diese neueren Erkenntnisse sind auch für die klinische Diagnostik bedeutungsvoll. Dabei hat bei diesem Bestreben nach einer differenzierteren Steroiddiagnostik die chromatographische Trennung als Methodik das größte Verdienst.

Die Entwicklung der biochemischen Steroidforschung

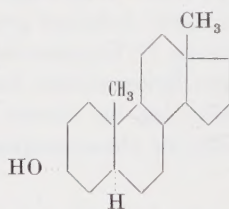
Der heutigen Ära der chemisch-quantitativen Bestimmung der 17-Ketosteroide, die im Jahre 1935 durch *Zimmermann* eingeleitet wurde, ging die biologische und chemische Erforschung verschiedener Steroidhormone voraus.

Im Jahre 1849 implantierte der Physiologe *Berthold* (Göttingen) Kapaunen Hoden unter die Rückenhaut und beobachtete so die Ausfallerscheinungen (Kammwachstum usw.). 1910 wiederholte *Steinach* ähnliche Versuche. *Koch* und *Moor* (Chicago) verwendeten erstmals zellfreie Extrakte und fanden dabei die gleiche Wirkung auf das Kammwachstum.

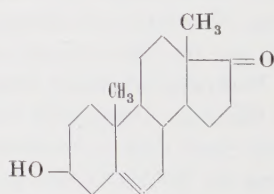
1918 fand *Pézar*, daß die applizierte Menge von Testesextrakt und die

Vergrößerung des Kapaunenkammes einander proportional sind. Seine Extrakte stellte er aus kryptorchiden Schweinetestes mit physiologischer NaCl-Lösung her. Damit war bewiesen, daß die Hormonbildung nicht an die Spermienbildung gebunden ist. *Funk* und *Loewe* fanden auch im Blut und im Urin «androgene Substanzen». *Callagher* und *Koch* gingen bei der Ausarbeitung ihres sogenannten Hahnenkammtests von der Beobachtung aus, daß bei frühzeitig kastrierten Hähnen das Kammwachstum sistiert. Nach Applikation von Testesextrakten konstatierten sie ein der applizierten Menge entsprechendes Wachstum. *Laqueur*, *Freud* und *de Fremery* definierten als Hahnenkammeinheit diejenige Menge Substanz, welche, während 4 hintereinanderfolgenden Tagen bei Kapaunen eingespritzt, am fünften Tag eine oberflächliche Vergrößerung des Hahnenkammes um 20% ergab.

Die erste Isolierung von zwei Steroiden aus dem Urin gelang im Jahre 1931 *Butenandt* und seinen Mitarbeitern. Es handelte sich um Androsteron und Dehydro-iso-androsteron. 1934 konnten sie die definitive Summenformel für Androsteron mit $C_{19}H_{20}O_2$ angeben. Sie postulierten, daß es sich um ein gesättigtes Oxyketon handle, das nach der Summenformel 4 Sechseringe haben müsse. Rasch verbesserten sie die Methode in bezug auf die Ausbeute. 1934 benötigten sie noch für die Isolierung von 1 g Androsteron 5000 l Urin. Auf Grund dieser Untersuchungen definierte man nun als sogenannte Kapauneneinheit diejenige Menge Substanz, die der Wirkung von 0,1 g Androsteron entspricht. Im Jahre 1934/35 gelang *Ruzicka* (Zürich) die Synthese des Androsteron aus Epi-Cholestanol. Dabei entstanden auch die Isomeren Iso-androsteron und Ätiocholanolon.

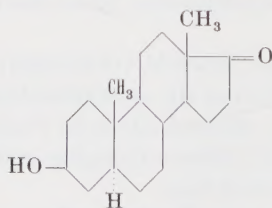


Androsteron (Androstan-3 [α]-ol-17-on)

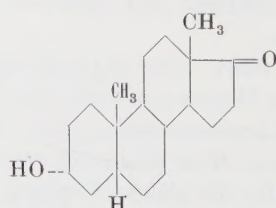


Dehydro-iso-androsteron
(Δ^5 -Androsten-3 [β]-ol-17-on)

1938/39 wurde durch *Callow* und seine Mitarbeiter das Iso-Androsteron und das Ätiocholanol-3(α)-on-17 aus Urin von normalen Personen isoliert.

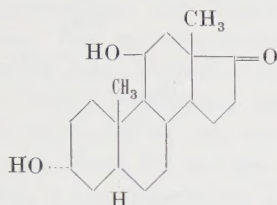


Iso-Androsteron



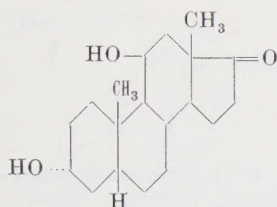
Ätiocholanol-3 (α)-on-17

Mason und Mitarb. fanden 1945 im Urin eines Patienten mit einem Neoplasma der Nebennierenrinde erstmals ein 17-Ketosteroid mit einer OH-Gruppe an C₁₁.



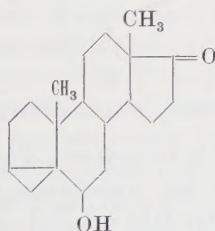
Androstandiol-3 (α)-11 (β)-on-17

Ein 17-Ketosteroid mit einer OH-Gruppe an C₁₁ isolierten Liebermann und Mitarb.



11-Hydroxy-ätiucholanol-3 (α)-on-17

E. Dingemanse, L. G. Huis in't Veld und S. L. Hartogh-Katz (1948) isolierten aus dem Urin eines 2jährigen Mädchens, welches Virilismus zeigte und bei dem später ein Nebennierenrinden-Tumor exstirpiert wurde, ein Ketosteroid, bei welchem es sich um ein Iso-Androstenolon handelt.



Iso-Androstenolon

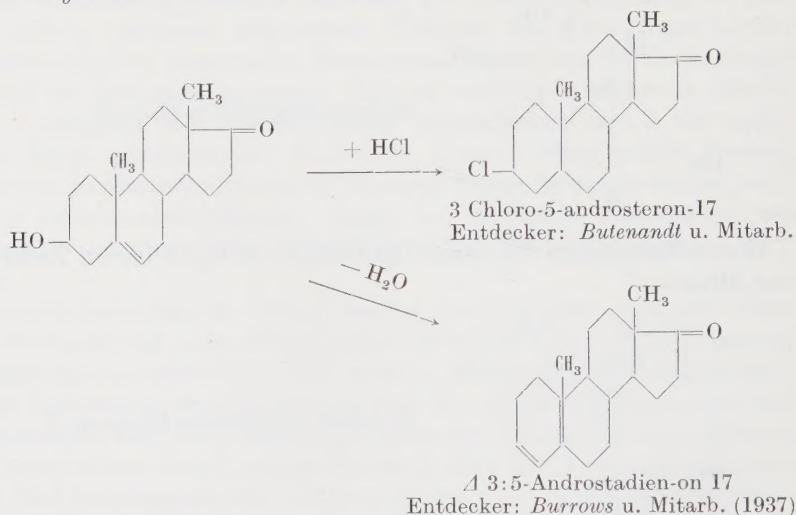
Dieses 17-Ketosteroid kommt im Urin von normalen Personen nach Angabe der holländischen Forscher und nach eigener Beobachtung nur in sehr kleinen Mengen vor.

Artefakte

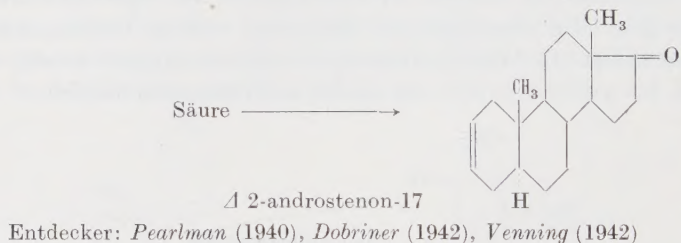
Bei der Mineralsauren Hydrolyse des Urins entstehen unvermeidliche Artefakte. Es kommt dabei leicht zur Spaltung von Wasser an C₃ oder z. B. bei Verwendung von HCl zur Chlorierung an derselben Stelle. Die chlorierten Steroide wurden von den Entdeckern als solche erkannt, dagegen waren

die durch Wasserabspaltung entstandenen Steroide schwieriger als solche zu erkennen.

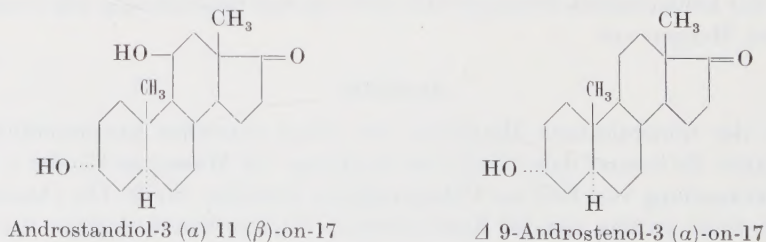
Aus Dehydro-iso-androsteron entsteht bei HCl saurer Hydrolyse:



Aus Androsteronsulfat entsteht durch Säureeinwirkung:



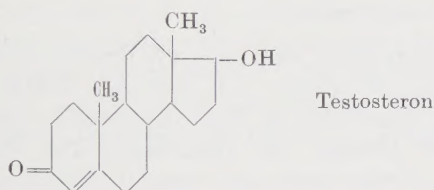
Dorfman und Mitarb. isolierten 1945 das Δ^9 -Androstenol-3(α)-on-17 aus dem Urin eines Patienten mit Hyperplasie der Nebennierenrinde. Von den Entdeckern wurde es anfangs nicht als Artefakt erkannt. Es entsteht aus Androstandiol-3(α)-11(β)-on-17, das noch im gleichen Jahr von Mason aus dem Urin eines Patienten mit Nebennierentumor isoliert wurde.



Die Muttersubstanzen der 17-Ketosteroide

a) Testes

Nach Isolierung des biologisch androgenen Androsteron glaubte man irrtümlicherweise, das eigentliche männliche Sexualhormon gefunden zu haben. Den entscheidenden Schritt zur Änderung dieser Ansicht bewirkten im Jahre 1935 die Untersuchungen von *Laqueur* mit seinen Mitarbeitern *David*, *Dingemans* und *Freud* in Amsterdam. Diese Forscher fanden im Stierenhoden eine etwa zehnmal wirksamere androgene Substanz als jene im Harn. Es war dies kein C_{17} -, sondern ein C_3 -Ketosteroid. Diese Substanz – das sogenannte Testosteron – wurde im gleichen Jahre durch *Ruzicka* und *Wettstein* aus Dehydroandrosteron synthetisch dargestellt. Die holländischen Autoren zeigten noch im selben Jahre, daß das synthetische und das aus Testes gewonnene Testosteron identisch sind.



Der aus Testes isolierte Extrakt war allerdings um ein Vielfaches stärker wirksam. Sie isolierten aus Testes eine Substanz, welche die biologische Wirksamkeit von Testosteron stark erhöhte. Sie nannten diesen Stoff X-Faktor. Ein Jahr später fanden *Miescher*, *Tschopp* und *Wettstein*, daß sie ebenso bei Zusatz von Fettsäuren die androgene Wirkung von Testosteron steigern können. Nach *Freud* handelt es sich beim X-Faktor um ein Gemisch von natürlichen, ungesättigten Fettsäuren. Bei Kastraten fand man eine verminderte 17-Ketosteroid-Ausscheidung. Man dachte deshalb folgerichtig, daß es sich beim Androsteron um ein Abbauprodukt von Testosteron handeln müsse. Verschiedene Arbeiten haben seither diese Annahme bestätigt. *Callow* (1939) und *Dorfman* (1940) waren die ersten, die im Androsteron und Ätiocholanolon Metaboliten von Testosteron erkannten. Bei Applikation von Testosteron findet man im Urin ein Ansteigen der androgenen Substanz, im speziellen eine Vermehrung von Androsteron und Ätiocholanolon. Neuere Arbeiten berechtigen allerdings zur Annahme, daß die genannten Metaboliten in geringeren Mengen auch aus der Nebennierenrinde stammen können.

b) Nebennierenrinde

Bei Kastraten findet man wohl eine Verminderung der 17-Ketosteroide im Urin, nicht aber ein vollständiges Sistieren (*Callow*, 1939). Auch im Urin von Frauen finden sich nicht wesentlich kleinere Mengen von 17-Ketosteroiden.

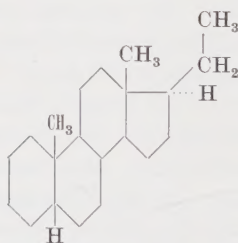
Man kam daher folgerichtig zur Annahme, daß außer den Gonaden noch andere Organe als Quellen der 17-Ketosteroide in Frage kommen müssen.

Für diese Hypothese fand man bald weitere Indizien. Bei Addison-Patienten, bei denen es anatomisch zu einer starken Einschränkung der Nebennierenrinde kommt, werden im Urin nur sehr kleine Mengen von 17-Ketosteroiden gefunden. Bei Hyperplasie, Adenomen und besonders bei malignen Tumoren der Nebennierenrinde kommt es hingegen im Urin zu einer starken Erhöhung der 17-Ketosteroide, manchmal bis über das Zehnfache des Normalen. In letzter Zeit gelang auch die Eruierung der 17-Ketosteroide, welche bei Dysfunktionen der Nebennierenrinde erhöht ausgeschieden werden.

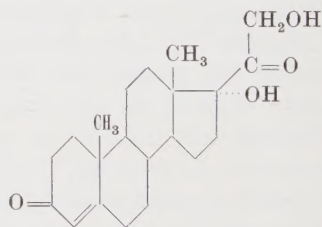
Durch diese Arbeiten sind uns die Hauptquellen verschiedener 17-Ketosteroide bekannt geworden.

c) Ovarien

Verschiedene Indizien sprechen dafür, daß auch die Ovarien androgene Substanzen produzieren können. So wurden z. B. auch bei virilisierenden Ovarialtumoren eine erhöhte Ausscheidung von Androsteron und Ätiocholanolon gefunden. Es gibt Autoren, wie *Dingemans* und *Huis in't Veld*, welche annehmen, daß als Muttersubstanz von Ätiocholanolon auch Pregnanderivate in Frage kommen könnten. *K. Dobriner* nimmt als eine weitere Quelle Compound S an.



Pregnan



Compound S

Methodik

Die 17-Ketosteroide sind im Urin zum großen Teil in konjugierter Form als Glukuron- oder Schwefelsäureester vorhanden und können ohne Hydrolyse nur ungenügend extrahiert werden. Der Urin wird daher nach Zusatz einer organischen Säure (in unserem Falle HCl) durch mehrstündiges Kochen verseift. Gleichzeitig erfolgt die Extraktion mit Benzol. Durch die Hydrolyse mit HCl besteht allerdings die Gefahr (die nicht ganz zu bannen ist), daß durch Einwirkung von Säure auf die bei der hydrolytischen Spaltung frei werdenden 17-Ketosteroide Artefakte gebildet werden (s. oben).

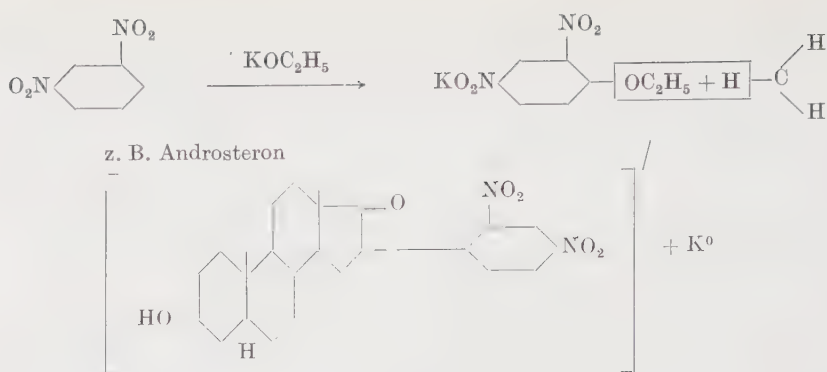
Bei der Hydrolysisierung mit HCl kommt es leicht zu Chlorierung an C₃ oder zu H₂O-Abspaltung. Diese Artefakte verfälschen natürlich das Bild bei der differenzierenden Analyse. Unser Ziel muß es sein, die 17-Ketosteroide so weit als möglich in ihrer ursprünglichen Form zu erhalten. Die Salzsäure bewirkt folgende Umsetzungen:

- | | |
|--|---|
| a) Dehydro-iso-androsteron | HCl → Δ^3 : 5-Androstadien-17-on |
| b) Dehydro-iso-androsteron | HCl → Δ^3 : 5-Chloro-androsten-on-17 |
| c) Androsteron-sulfat | HCl → Androsten-on-17 |
| d) Androstadiol-3(a)-11(β)-17-on | HCl → Androstenol-3(a)-17-on |

Nach *E. Dingemans* lassen sich a) und b) weitgehend verhindern. Der Urin wird daher zunächst ohne Zusatz von HCl extrahiert. Damit gelingt es, die nicht veresterten 17-Ketosteroide zu isolieren. Dann erst wird mit steigendem Zusatz von Salzsäure verseift. Der saure Extrakt wird gewaschen und dann mit dem neutralen vereinigt. Durch Filtration werden sie mechanisch gereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und anschließend zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird mit Benzol-Alkohol-Gemisch aufgenommen und ein Teil davon zur direkten Totalanalyse oder für die chromatographische Trennung und Bestimmung verwendet.

Die kolorimetrische Bestimmung nach der Zimmermannschen Reaktion

Zimmermann zeigte 1935, daß gewisse androgene Stoffe im Urin in Anwendung der Saffé-Bittoschen Reaktion mit *m*-Dinitrobenzol in alkalischem Milieu eine violette Färbung geben, wobei Form und Höhe der Absorptionskurve wesentlich vom Lösungsmittel abhängen. Er schlägt C₂H₅OH als besonders geeignet vor. Durch Steigerung der Alkalikonzentration läßt sich das «Hormon» neben sonst störenden Begleitstoffen im Photometer bestimmen. Die Absorptionskurve wird dadurch deutlich gegen das Gebiet der kurzen Wellen verschoben. Die Farbintensität ist stark zeitabhängig, die Wahl von 60 Minuten willkürlich. In Übereinstimmung der van Hoffschen Regel zeigt sich eine Abhängigkeit von der Temperatur derart, daß bei einem Anstieg von 15–25° die Reaktionsgeschwindigkeit um das 2,2fache steigt. Dies bedeutet pro Grad 8,2% Zunahme des Extinktionskoeffizienten. Nach *Zimmermann* scheint Licht die Reaktion zu verlangsamen. Der Reaktionsmechanismus und die Konstitution des entstehenden Farbsalzes sind nicht sicher bekannt. Es handelt sich um die Reaktion eines Körpers mit aktiver Methylengruppe einerseits, mit einem Polynitrokörper und Lauge andererseits (*W. Zimmermann*, Diss. Bonn 1936). Es kommt somit primär zu einer Anlagerung von Kaliumäthylat an den Nitrokörper und darauffolgend zur Abspaltung von C₂H₅OH zwischen den ersten Anlagerungsprodukten und der aktiven Komponente



Die chromatographische Trennung der 17-Ketosteroide

Seitdem der Gründer der chromatographischen Trennungsmethode, *Twelt*, diese erstmals zur Trennung und Isolierung farbiger Komponenten verwendet hat, ist sie heute zu einer in der biochemischen Analyse unentbehrlichen Methode entwickelt worden. Seit 1931 wird die Chromatographie auch zur quantitativen Trennung chemisch sich nahestehender Substanzen verwendet. Ihr Prinzip beruht auf der Tatsache, daß die Verteilung verschiedener Stoffe zwischen Lösung und einem Adsorbens entsprechend der Adsorptionsthermen, also gesetzmäßig stattfindet. In unserem Fall verwenden wir als Adsorbens aktives Aluminiumoxyd. Es wird in eine senkrecht aufgestellte Glasröhre eingefüllt. Die 17-Ketosteroide lagern sich entsprechend ihrer Struktur mit verschiedener Intensität an die Aluminiumoxydteilchen an. Bei der Elution mit einem oder verschiedenen geeigneten organischen Lösungsmitteln (in unseren Bestimmungen: Benzol mit steigendem Zusatz von Alkohol) passieren die weniger stark adsorbierten Stoffe die Säule mit entsprechend größerer Geschwindigkeit. Durch fortlaufende geeignete Elution gelingt es, das 17-Ketosteroid-Gemisch in acht charakteristische Gruppen zu trennen. Die Grundlage für diese Methode wurde von *de Laet* am Laqueur-Institut in Amsterdam geschaffen. Die eigentliche Methodik aber haben *E. Dingemanse* und *L. G. Huis in't Veld* am gleichen Institut entwickelt. Wir haben diese Methode im wesentlichen übernommen.

Diese Gruppen werden durch folgende 17-Ketosteroide dargestellt:

Gruppe:	Artefakte
	Δ 3-5-Androstadien-17-on
	Δ 5-Chloro-androstadien-17-on
	Δ 2-Androstenon
Gruppe II:	Iso-Androstenolon
Gruppe III:	Dehydro-iso-androsteron
Gruppe IV:	Androsteron
Gruppe V:	Ätiocholanol-3(a)-on-17

Gruppe VI:	11-Hydroxy-androsteron
Gruppe VII:	11-Hydroxy-ätiocholanol-3(a)-on-17
Gruppe VIII:	noch nicht näher abgeklärte 17-Ketosteroide, wahrscheinlich ebenfalls Artefakte.

Technik

a) Chemikalien

Alkohol. Für die kolorimetrische Bestimmung muß der Alkohol absolut rein und trocken sein. Er wird über Natrium-Metall getrocknet und zweimal destilliert. Er soll keine Ketone und keine Aldehyde enthalten. Nur für das Auffüllen der einzelnen Proben, nach der Farbentwicklung im Wasserbad, genügt 96%iger Alkohol.

Benzol. Für die Extraktion wird Benzol pur. nach Ph. H. V verwendet. Für die chromatographische Bestimmung, d. h. zur Elution, wird dieses Benzol zweimal destilliert. Der «Vorlauf» darf nur für die Extraktion verwendet werden.

KOH. Alkoholische Kalilauge (2,5 n) verfärbt sich innerhalb weniger Tage und kann dann nicht mehr zur kolorimetrischen Analyse verwendet werden. Wir haben daher mit einer von H. Wilson und P. Gartner angegebenen Kalilauge gearbeitet:

100 cm³ absoluter Alkohol werden unter Eiskühlung mit 15 mg Ascorbinsäure in kleinen Portionen versetzt. Da sich die Ascorbinsäure nur sehr schwach in Alkohol löst, entsteht eine Suspension. Nun gibt man 25–30 g feingepulvertes KOH dazu. Man läßt einige Sekunden Stickstoff durchströmen, verschließt die Flasche gut und schüttelt während 5 Minuten. Nun wird in N₂-Atmosphäre filtriert. Das Filtrat wird unter Eiskühlung aufgefangen. Es werden weitere 15 mg Ascorbinsäure zu 100 cm³ Alkohol zugesetzt und die beiden Lösungen vereinigt. Dann wird auf 2,5 n KOH eingestellt. Das Reagens muß unter Stickstoff aufbewahrt werden. Die Ascorbinsäure stört nicht.

Aluminiumoxyd. Mittelfeines, nach «Brockmann» (1097, Firma Merck, Darmstadt) standardisiertes Aluminiumoxyd. Bei Verwendung von sehr feinem Aluminiumoxyd wird die Passage bei der Elution sehr langsam. Das Aluminiumoxyd wird über Schwefelsäure (spez. Gewicht 1,4800–1,4900) während mindestens 8 Tagen auf einen konstanten Wassergehalt gebracht.

m-Di-nitro-benzol: Das analysenreine m-Di-nitro-benzol wird einmal aus Alkohol umkristallisiert. Es werden 2 g in 100 cm³ Alkohol gelöst. Diese Lösung muß im Eisschrank aufbewahrt werden.

b) Ausführung

1. Hydrolyse und Extraktion

Von 3×24-Stunden-Urin werden 1500 cm³ (evtl. auch nur eine Tagesmenge) für die Analyse verwendet. Der Urin wird nach Zusatz von ca. 500 cm³ Benzol auf dem Wasserbad am Rückflußkühler während 5 Stunden erhitzt. Dann wird der überstehende Benzolextrakt, nachdem er sich abgekühlt hat, abgehebert. Es werden weitere 500 cm³ Benzol zugesetzt und in gleicher Weise 5 Stunden gekocht. Nachdem das Benzol wieder dekantiert worden ist, werden 50 cm³ HCl (25%ig) und frisches Benzol zugefügt und während 4 Stunden erhitzt. Nach Abheberung des Benzolextraktes und Zugabe von nochmals 50 cm³ HCl und Benzol wird die Hydrolyse und Extraktion noch weitere 6 Stunden fortgesetzt. Nach dem Waschen des sauren Extraktes mit destilliertem Wasser in einem Scheidetrichter (bis das Waschwasser auf Kongopapier neutral reagiert), werden beide Extrakte vereinigt, durch Glaswolle oder Quarzsand filtriert und schließlich über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet.

Anschließend wird er bis zur Trockne eingengt. Der größte Teil des Benzols wird abdestilliert, den Rest läßt man unter dem Abzug in einer Porzellanschale verdunsten. Der Rückstand wird mit 10 cm³ Benzol/Alkohol 1:1 aufgenommen = Extrakt A.

2. Photometrische Bestimmung

Für die Totalanalyse wird 1 cm³ des Extraktes A mit Benzol auf 10 cm³ verdünnt und davon 0,2 oder 0,5 cm³ (je nach der zu erwartenden Steroidmenge) für die photometrische Bestimmung verwendet. Diese Probe wird in einem elektrisch geheizten Sandbad unter Absaugen des sich entwickelnden Benzoldampfes zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird mit 0,2 cm³ Alkohol absol. gelöst und dieser Lösung 0,2 cm³ *m*-Di-nitro-benzol zugesetzt. Es wird etwas geschüttelt und ca. 5 Minuten stehen gelassen. Dann werden 0,2 cm³ KOH zugegeben. Die Lösung kommt genau 45 Minuten in einen vor Lichteintritt geschützten Wasserthermostaten von 27° C. Anschließend wird sofort photometriert. Für jede Analyse wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. In jeder Analysenserie werden zwei Standardbestimmungen ausgeführt.

Standard I: die zugesetzten 0,2 cm³ Alkohol enthalten 100 γ 17-Ketosteroid.

Standard II: die zugesetzten 0,2 cm³ Alkohol enthalten 50 γ 17-Ketosteroid.

Blancolösung: 0,2 cm³ absol. Alkohol.

Vor der Photometrie werden die Proben mit 96%igem Alkohol auf 10 cm³ aufgefüllt. Die Messung der Extinktion erfolgt in den Wellenlängen 540 mμ und 420 mμ. Es wird gegen die Leerlösung photometriert. Da die Extinktion aller 17-Ketosteroide praktisch gleich ist, kann für die Standardlösung jedes beliebige 17-Ketosteroid verwendet werden. Wir verwendeten das verhältnismäßig leicht erhältliche Dehydroiso-androsteron oder Androsteron.¹

Berechnung der effektiven 17-Ketosteroid-Extinktion nach der Formel von Fraser

Bei der Zimmermannschen Reaktion kommt es neben der typischen Violett-Färbung zu einer atypischen gelblichen Farbentwicklung. Für die Eliminierung dieser störenden Farbreaktion haben wir, wie die genannten holländischen Autoren, die von Fraser und Mitarb. im Jahre 1941 publizierte Formel angewendet. Die Extinktion wird in zwei Wellenlängen gemessen. So besteht bei 540 mμ die eigentliche Extinktion aus jener der 17-Ketosteroide und aus der Extinktion der atypischen Färbung. Auch bei 420 mμ messen wir die Summe beider Extinktionen. Aus diesen Messungen läßt sich die Extinktion der 17-Ketosteroide durch eine einfache Formel bestimmen.

$$E_v = E_{ks\ v} + E_{ver, v} E_{ks\ gr} = \frac{2,4 E_{gr} - E_v}{2,4 - 0,40} - \frac{2,4 E_{gr} - E_v}{2}$$

E_v = Extinktion bei 420;

E_{gr} = Extinktion bei 540 mμ

E_{ks} = Extinktion der 17-Ketosteroide

E_{ver} = Extinktion der Verunreinigungen

Photometer. Für die photometrischen Bestimmungen wurde ein Spektrophotometer nach «Siegrist» verwendet. Bei den üblichen elektrischen Photometern dient bekanntlich der in einer Photozelle erzeugte lichtelektrische Photostrom als Meßgröße, wobei häufig zwei solcher Zellen für das zu messende und das Vergleichsmedium verwendet werden. Bei der sogenannten Flimmermethode, wie sie bei dem von uns verwendeten Photometer gebraucht wird, wird der Lichtstrahl in raschem Wechsel durch das zu messende und das Vergleichsmedium auf eine einzige Photozelle gelenkt. Das Photometer kann direkt an den Netzstrom angeschlossen werden.

¹ Wir danken der Ciba AG. für die Überlassung dieser Substanzen.

3. Die chromatographische Trennung der 17-Ketosteroide

Der Durchmesser der Chromatographieröhre ist 15 mm. Als Adsorbens werden 16 g Al_2O_3 (nach *Brockmann*) verwendet. Dieses wird vor der Verwendung in einem Exsikkator über 58%iger Schwefelsäure (spez. Gewicht = 1,48–1,49) auf einen konstanten Wassergehalt gebracht. Die Kontrolle der Schwefelsäure wird jeden zweiten Tag vorgenommen. Das Al_2O_3 darf erst für die Analyse verwendet werden, wenn sich während 8 Tagen die Konzentration der Schwefelsäure nicht geändert hat. 16 g Aluminiumoxyd werden unter Beklopfen der Röhre von oben eingefüllt. Nach Zugabe der Hälfte Al_2O_3 wird durch einen kleinen Wattebausch unterbrochen. Das Al_2O_3 wird oben und unten durch einen Wattebausch verschlossen. Auf die obere Watterschicht werden noch 1 g CaCO_3 zugegeben. An das Elutionsgefäß kann ein leichter Unterdruck angelegt werden. Seit wir aber von sehr feinem zu mittelfeinem Al_2O_3 übergegangen sind, ist er meistens überflüssig. Die Elution geht am Anfang oft sehr langsam vor sich, kommt aber dann nach 4–5 Fraktionen meist gut in Gang. Wenn das nicht der Fall ist, wird mit einem leichten Unterdruck gearbeitet. (Kontrolle mit der Tropfenzahl, die 50/Min. nicht übersteigen soll.) Die regelmäßige Passage läßt sich an den auftretenden Farbsalzen aus dem Urin, die sich in den verschiedenen Farben präsentieren, teilweise beurteilen.

Vom Extrakt werden $\frac{1}{3}$ oder $\frac{1}{5}$ der Tagesmenge, je nach der bei der Totalanalyse festgestellten Steroidmenge, abpipettiert und vorsichtig fast bis zur Trockne eingedampft. Aufnahme in 50 cm³ reinem Benzol. Die Al_2O_3 -Säule wird mit etwa 30 cm³ Benzol gespült und dann der Extrakt zugegeben. Wenn der Wattebausch wieder trocken ist, wird mit der Elution begonnen.

Es wird eluiert mit: 8mal 50 cm³ Benzol absolut.;

24mal 50 cm³ Benzol + 0,1% Alkohol absolut.;

10mal 50 cm³ Benzol + 0,5% Alkohol absolut.;

6mal 50 cm³ Benzol + 2,0% Alkohol absolut.;

1mal 50 cm³ Alkohol 96%.

Chromatogramm. Bei der Darstellung der in den 48 Fraktionen festgestellten Steroidmengen in einem Chromatogramm können wir unter normalen Verhältnissen 8 charakteristische Gruppen unterscheiden. Die Fläschchen werden vor Beginn der Analyse von 1–48 numeriert. Die 48 Fraktionen werden auf genau 50 cm³ mit Benzol aufgefüllt, gut gemischt und aus jeder Fraktion 0,5 cm³ herauspipettiert in ein 10cm³-Meßkölbchen. Auf dem Sandbad wird zur Trockne eingengt und dann damit die Reaktion nach *Zimmermann* ausgeführt (s. S. 12). Für die Darstellung in einem Chromatogramm werden die Fraktionen auf der Abszisse, die Menge an Ketosteroiden auf der Ordinate aufgetragen. Unter richtigen Bedingungen lassen sich acht verschiedene Gruppen unterscheiden (s. S. 10).

Eichung der Al_2O_3 -Säule. Im Verlaufe der Fraktionierung ist es unbedingt erforderlich, daß bei den verschiedenen Analysen die Al_2O_3 -Säule immer unter konstanten Bedingungen gehalten wird. Nur so ist es möglich, vergleichbare Werte zu erhalten. Die Erfahrung lehrt, daß der Wassergehalt der Al_2O_3 -Säule sehr wichtig ist. Benzol und Alkohol, mit denen eluiert wird, müssen ganz trocken sein. Bei Verwendung von zu feinkörnigem Aluminiumoxyd wird die Passage der Elutionsflüssigkeit so langsam, daß man ohne Herstellung eines Unterdruckes am untern Ende der Röhre nicht auskommt.

Eine *Eichung* der Al_2O_3 -Säule kann erfolgen durch Isolierung der die entsprechenden Gruppen darstellenden Fraktionen, die dann chemisch weiter identifiziert werden können (Schmelzpunkt, Derivate usw.). Viel einfacher ist eine Eichung möglich durch Zusatz eines bekannten, reinen 17-Ketosteroides direkt auf die Säule oder zu einem Extrakt mit bekanntem Chromatogramm und anschließender üblicher Elution.

Es wurden beide Methoden benützt. Die untenstehende Abb. 1 zeigt nebeneinander die Chromatogramme von 2 Al_2O_3 -Säulen. Der ersten Säule wurde reines Dehydro-iso-androsteron zugesetzt (ausgezogene Linie), der andern Säule reines Androsteron (punktirierte Linie).

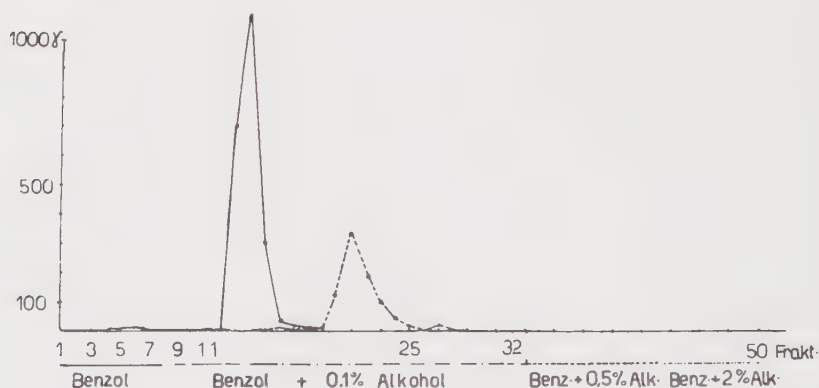


Abb. 1. Eichung der Al_2O_3 -Säule. — Chromatographie nach Zugabe von reinem Dehydro-iso-androsteron; Chromatographie nach Zugabe von reinem Androsteron.

Klinische und experimentelle Anwendung

Die 17-Ketosteroid-Ausscheidung vermittelt einen Einblick in die Funktion der Nebennierenrinde, der Gonaden und im weiteren Sinne auch der Hypophyse. Sie spielt daher eine wichtige Rolle in der klinischen Diagnostik endokriner Störungen. In vielen Fällen gibt uns schon die Gesamtmenge der ausgeschiedenen 17-Ketosteroido genügend Aufschluß. So bekommen wir z. B. bei bestimmten Nebennierentumoren eine so hohe, oft um das Vielfache vermehrte Ausscheidung, daß allein durch diese chemische Bestimmung die Diagnose gesichert werden kann. Da aber bei verschiedenen endokrinologischen Krankheitsbildern charakteristische Verschiebungen in der Zusammensetzung der verschiedenen 17-Ketosteroido erfolgen, wobei die Totalanalyse eine normale Ausscheidung vortäuschen kann, gewinnt die differenzierende Analyse durch chromatographische Trennung des 17-Ketosteroid-Gemisches an Bedeutung. Zu einer unbedingten Notwendigkeit wird die differenzierende Analyse bei experimentellen Untersuchungen über den intimeren Stoffwechsel der verschiedenen Steroide.

1. Endokrinologisch normale Personen

Wir haben bisher bei etwa 150 Personen, die endokrinologisch als normal bezeichnet werden konnten, die 17-Ketosteroid-Ausscheidung untersucht. Als Maßstab in der Beurteilung dienten die Mitteilungen des pharmako-

therapeutischen Institutes der Universität Amsterdam, das über ein sehr großes Untersuchungsmaterial verfügt. Es werden als Grenzen der Norm angegeben: Männer: 10–30 mg täglich; Frauen: 5–15 mg täglich. Unsere eigenen Erfahrungen decken sich mit diesen Angaben.

Bei klinisch völlig normal bezeichneten Versuchspersonen (50 Männer und 35 Frauen) haben wir die 17-Ketosteroid-Ausscheidung untersucht. Die gefundenen Werte sind in der folgenden Tafel in Form einer Streukurve dargestellt (Abb. 2a und b).

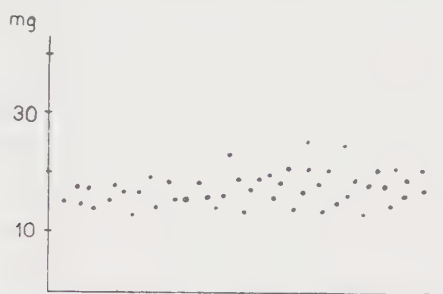


Abb. 2a.



Abb. 2b.

Abb. 2. a) 17-Ketosteroide bei normalen Männern; b) 17-Ketosteroide bei normalen Frauen.

Bei den normalen Versuchspersonen finden wir alle Werte ausnahmslos innerhalb der von den holländischen Autoren angegebenen Grenzen. Wir finden allerdings die Werte bei Männern viel häufiger zwischen 10 und 20 mg als zwischen 20 und 30 mg täglich. Bei Frauen liegen die Werte ziemlich regelmäßig zwischen 5 und 15 mg täglich verteilt.

2. Endokrinologisch pathologische Zustandsbilder

a) Verminderte Ausscheidung der 17-Ketosteroide

Bei den folgenden Krankheitsbildern fanden wir eine verminderte 17-Ketosteroid-Ausscheidung. Sie betreffen Zustände, bei denen es zu einer verminderten Produktion von Steroiden der Ursprungsorgane kommt oder bei denen vermutlich der Abbau der Ursprungssteroiden zu den 17-Ketosteroiden gestört ist. Die Ursachen können sehr verschiedene sein. Das hormonale Defizit, gemessen an der 17-Ketosteroid-Ausscheidung, kann durch

anatomische Einschränkung des produzierenden Gewebes (Nebennieren-Tbc., Kastration usw.) oder durch verminderte «Anregung» dieser innersekretorischen Organe durch ihnen übergeordnete Zentren bedingt sein.

I. Morbus Addison

Bei diesem erstmals im Jahre 1855 von Addison beschriebenen Krankheitsbilde finden wir als hervorstechende klinische Symptome: Adynamie, Hypotonie, braune Pigmentierung der Haut und der Schleimhäute und charakteristische Veränderungen im Salz-, Zucker- und Stickstoffhaushalt.

Pathologisch-anatomisch findet sich bei klassischen Fällen immer eine schwere Beeinträchtigung der Nebennierenrinde, häufig durch eine Tuberkulose. Leichtere Fälle, bei denen eher eine funktionelle Insuffizienz vermutet wird, pflegt man als «Addisonismus» zu bezeichnen.

Die untenstehende Tabelle 1 zeigt die bei den von uns untersuchten Addison-Patienten gefundene 17-Ketosteroid-Ausscheidung.

Tabelle 1.

Nr., Patient und Geschlecht	Alter	17-Keto- steroid mg/Tag	Klinik
1. M. E. ♂	39	3,1	Pigmentierung der Haut, nicht der Schleimhaut. Blutdruck 105/70. Auf Adrenalin Blutdrucksenkung. Magendarmstörungen.
2. A. M. ♂	42	2,1	Pigmentierung der Haut und der Schleimhaut. Adynamie, Cutler-Test ++.
3. S. M. ♂	28	1,8	Pigmentierung der Haut und der Schleimhaut. Blutdruck 100/70. Adynamie.
4. P. M. ♂	46	2,7	Mundschleimhaut pigmentiert. Blutdruck 90/60. Kalium 19,2, Calcium 10,1, Chloride 364. Cutler-Test +++.
5. L. M. ♀	37	1,2	Schleimhaut braun pigmentiert. Haut dunkel. Blutdruck 110/60. Adynamie.
6. T. J. ♂	32	3,4	Tbc.-Anamnese. Hypotonie. Braune Pigmentierung von Haut und Schleimhaut.
7. B. M. ♀	17	4,3	Tbc.-Anamnese. Verkalkungen in der Nebenniere re., röntgenol. Blutdruck 100/70. Braune Pigmentierung von Haut und Schleimhaut. Abnorme Zuckerbelastungskurve nach Staub. Cutler-Test +++.
8. B. E. ♀	43	1,7	Addison mit häufigen Krisen. Tbc.-Anamnese. Streuherde in beiden Lungenspitzen. Blutdruck 75/65. Adynamie, Erbrechen. Cutler +++.
9. E. D. ♂	38	2,9	Braune Pigmentierung von Haut und Schleimhaut. Blutdruck 100/70. Adynamie. Häufiges Erbrechen. Tbc. in der Familie.

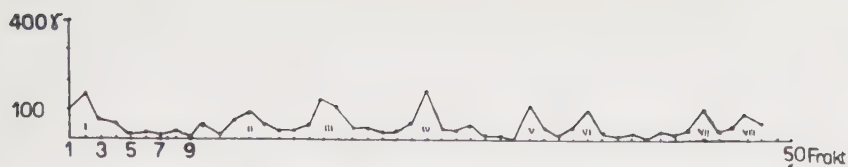


Abb. 3. Chromatographische Trennung der 17-Ketosteroide bei Morbus Addison.
 Resultat: gleichmäßige Verminderung aller 17-Ketosteroid-Fractionen.

II. Die 17-Ketosteroid-Ausscheidung bei Kastraten

Es wurden Kastraten untersucht, bei welchen operativ (meist aus psychiatrischer Indikation) die Testes entfernt worden waren.

Tabelle 2.

Nr.	Patient, Geschlecht	Alter	17-Ketosteroid- Ausscheidung mg/Tag	
32	K. K. ♂	34	4,7	Testes operativ entfernt
33	M. E. ♂	32	0,0	Testes operativ entfernt
34	St. A. ♂	32	6,7	Testes operativ entfernt
35	Sch. F. ♂	21	11,1	Testes operativ entfernt
36	F. E. ♂	56	10,2	Testes operativ entfernt
37	L. H. ♂	74	5,3	Kryptorchismus. Gynäkomastie

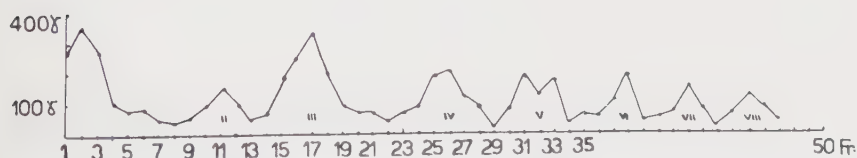


Abb. 4. Chromatographische Trennung der 17-Ketosteroide bei einem Kastraten (Fall Nr. 36). 17-Ketosteroid-Ausscheidung pro Tag 10 mg. Allgemeine Verminderung aller 17-Ketosteroide mit Ausnahme von Dehydro-iso-androsteron, das verhältnismäßig leicht erhöht ist.

3. Lebercirrhose

Burril und Krisesky haben schon auf Grund ihrer Untersuchungen angenommen, daß das Testosteron in der Leber abgebaut wird. Bei Lebererkrankungen fand Patrono 1941 nach Testosteronapplikation nur einen unbedeutenden Anstieg von Androsteron im Urin, was auf einen Abbau in der Leber hinweist.

Tabelle 3 zeigt die tägliche Ausscheidung an 17-Ketosteroiden bei Patienten mit Lebercirrhose oder Hepatitis.

Tabelle 3.

Nr., Patient, Geschlecht	Alter	17-Keto- steroid	Klinische Diagnose
1. C. F. ♂		4,9	Lebercirrhose
2. G. E. ♂	51	14,9	Lebercirrhose nach M. Bang. Subicterus, große derbe Leber. Quick 70. Abdominalglatze, ausgedehnte Venenzeichnung, spärliche Axillabehaarung
3. G. F. ♂	67	5,2	Lebercirrhose. Diabetes mellitus
4. M. J. ♂	58	3,2	Abdomen. Geringe Schambehaarung. Impotenz. Schwerer Diabetes mellitus
5. M. Sp. ♂	59	6,4	Lebercirrhose
6. R. J. ♀	44	4,0	Cholangiitische Lebercirrhose. Morgagnisches Syndrom?
7. K. H. ♂	40	1,5	Lebercirrhose
8. M. F. ♀	68	5,9	Leberschaden
9. St. W. ♂	41	6,2	Panzerherz, Stauungsleber. Morbus Friedl-Pick. Haarausfall am Abdomen, Ascites
10. W. E. ♂	47	1,9	Lebercirrhose
11. S. K. ♂	40	4,2	Lebercirrhose mit Ascites
12. M. K. ♂	53	9,0	Lebercirrhose
13. O. W. ♂	51	8,0	Lebercirrhose. Alkoholiker
14. S. E. ♂	38	15,4	Lebercirrhose
15. W. L. ♂	44	11,0	Lebercirrhose. Icterus
16. A. K. ♂	32	4,7	Hepatitis epidemica
17. S. L. ♂	27	6,7	Hepatitis epidemica
18. U. T. ♂	46	10,5	Lebercirrhose

Resultat. Bei verschiedenen Leberschäden (entzündlichen oder degenerativen Charakters) finden wir eine Verminderung der 17-Ketosteroid-Ausscheidung im Urin. Eine Bevorzugung bestimmter Steroide können wir bei unserem Chromatogramm nicht annehmen. Wie wir heute mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen dürfen, erfolgt der Abbau der Steroidhormone zum größten Teil in der Leber. Bei ausgedehnter Schädigung des Leberparenchyms (Cirrhose, Hepatitis) finden wir eine verminderte Ausscheidung der 17-Ketosteroide. Wir haben bei der Lebercirrhotikern Werte gefunden, wie sie sonst eigentlich nur bei Addison-Patienten beobachtet werden.

Experimentelles

Versuch 1

Normale Personen und Patienten mit einer Lebercirrhose erhielten während 5 Tagen Testosteron-propionat i.m. in täglichen Dosen von 100 bis

300 mg. Der Urin wurde am 3., 4. und 5. Tag gesammelt und die 17-Ketosteroide bestimmt. Die Analyse der Gesamt-17-Ketosteroide ergab folgende Werte (Tab. 4).

Tabelle 4.

Nr., Person, Geschlecht	Alter	17-KS vor Behandlung mg	Testosteron-Dosis mg	17-KS-Ausscheidung unter Behandlung	Ausscheidung in % der Aufnahme
a) Versuchspersonen					
1. K. E. ♂	56	10,2	300	152	31
2. S. E. ♂	38	15,4	120	43,7	28
3. M. H. ♂	42	18,1	100	41,5	23
4. Z. K. ♂	45	14,5	100	43,1	29
5. St. L. ♂	54	12,4	100	32	20
b) Cirrhotiker					
9. M. J. ♂	58	5,2	100	21	16
10. W. E. ♂	47	1,9	50	8	12
11. S. K. ♂	40	4,2	100	17,4	13
12. M. K. ♂	53	9,0	100	20,2	11
13. O. W. ♂	51	8,0	100	13,5	5

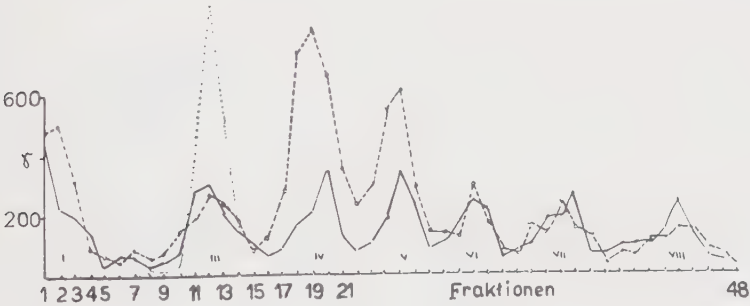


Abb. 5. St. L. ♂, 54 J. Normale Versuchsperson. — vor Testosteron-propionat; . unter Testosteron-propionat 100 mg/die; --- Eichung mit Dehydro-iso-androsteron.

Abb. 5 zeigt das Chromatogramm einer normalen Vergleichsperson (Nr. 5) vor und unter Applikation von Testosteron-propionat 100 mg/die i.m.

Abb. 6 zeigt das Chromatogramm eines Patienten mit einer Lebercirrhose (Nr. 9) vor und unter Applikation von Testosteron-propionat 100 mg/die i.m.

Resultat. Beim Patienten mit Lebercirrhose finden wir nach Testosteron nur einen kleinen Anstieg der Gruppen IV und V, welche im wesentlichen die Testosteronmetaboliten Androsteron und Ätiocholanolon darstellen.

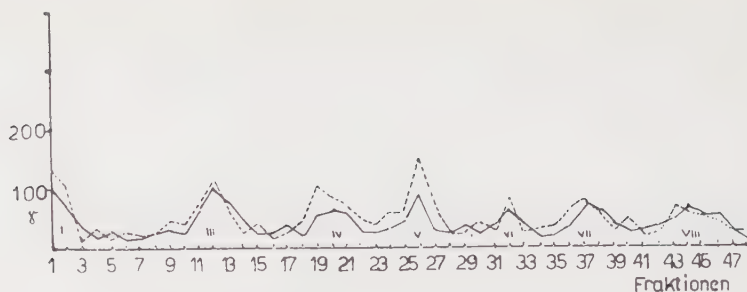


Abb. 6. S. W. ♂, 51 J. Lebercirrhose. — vor Testosteron-propionat; unter Testosteron-propionat 100 mg/die

Im Gegensatz dazu ist bei der normalen Versuchsperson bei gleicher Testosterondosierung der Anstieg der genannten 17-Ketosteroide viel stärker.

Versuch 2

Normale Personen und Patienten mit einer Lebercirrhose erhielten während 5 Tagen Dehydro-iso-androsteron-acetat 100 mg täglich i.m. Der Urin wurde am 3., 4. und 5. Tag gesammelt und die 17-Ketosteroide bestimmt.

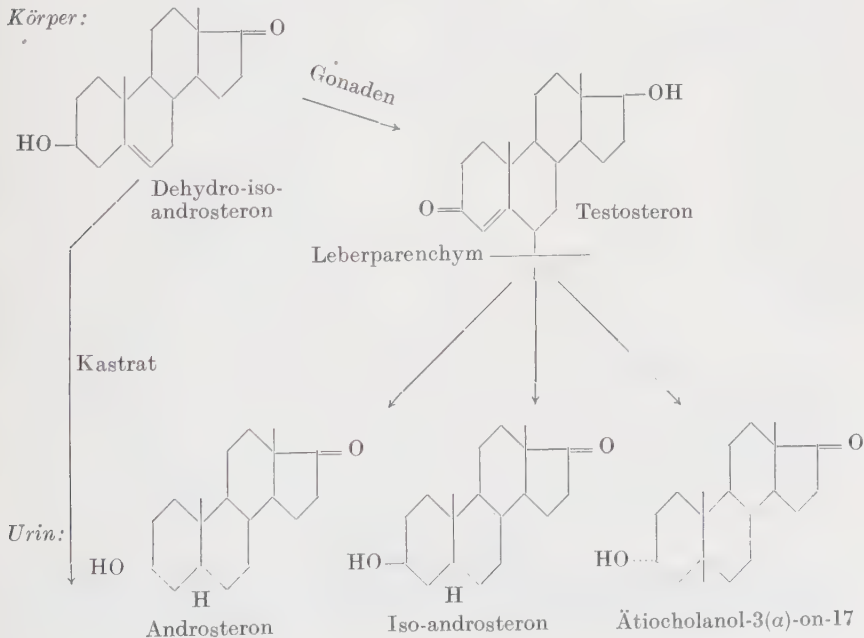
Tabelle 5.

Nr., Person, Geschlecht	Alter	17-KS vor Behandlung mg	Deh. i. andr. Dosis mg	17-KS-Aus- scheidung unter Be- handlung mg	Ausscheidung in % der Aufnahme
<i>a) Normale Personen</i>					
11. M. M. ♂	31	19,6	100	57,3	38
12. S. T. ♂	52	13,9	100	48,6	35
13. M. W. ♂	32	17,5	100	54,6	37,9
<i>b) Patienten mit Lebercirrhose</i>					
10. W. E. ♂	47	1,9	100	46,2	31
15. W. L. ♂	44	11,0	100	36,7	27,5
18. U. T. ♂	46	10,5	100	30,5	20

Resultat. Bei Verabreichung von Dehydro-iso-androsteron-acetat i.m. 100 mg täglich liegen bei den oben beschriebenen Fällen die 17-Ketosteroid-Ausscheidungsmengen bei den normalen Personen zwischen 38 und 35 mg täglich, bei den Cirrhotikern zwischen 31 und 20 mg täglich. Der Durchschnitt der 17-Ketosteroid-Ausscheidung liegt somit beim Normalen etwas höher als beim Cirrhotiker.

*Diskussion der Versuche mit Testosteron-propionat
und Dehydro-iso-androsteron-acetat bei Lebercirrhotikern*

Unsere Untersuchungen führten zu interessanten Unterschieden im Abbau und Umbau verschiedener Steroide zwischen normalen Versuchspersonen und Lebercirrhotikern. Während beim Normalen nach parenteraler Verabreichung von Testosteron, dem männlichen Sexualhormon, eine wesentliche Steigerung der Ausscheidung der Gesamt-17-Ketosteroide erfolgt, ist diese Erhöhung beim Leberkranken viel geringer. Die chromatographische Analyse zeigte, daß der erhöhte Anfall besonders die Gruppen IV und V betrifft, d. h. daß Androsteron und Ätiocholanolon, die Abbau-
produkte des Testosterons, beim Normalen im Gegensatz zum Cirrhotiker vermehrt ausgeschieden werden. Es muß also der Abbau des Testosterons über die Leber gehen. Testosteron selber können wir im Urin, da es kein 17-Ketosteroid ist, mit unserer Methode begreiflicherweise nicht nachweisen. Außerdem ist bekannt, daß es im Urin praktisch nicht ausgeschieden wird. Wenn wir nun aber auch bei Verabreichung von Dehydro-iso-androsteron Unterschiede – wenngleich viel geringeren Grades – zwischen Normalen und Cirrhotikern finden, darf man vielleicht den Schluß ziehen, daß ein kleiner Anteil (die Differenz zwischen Normalen und Cirrhotikern) des Dehydro-iso-androsterons nicht als solches allein ausgeschieden wird, sondern zuerst zu Testosteron umgebaut wird. Wir haben gute Gründe an-



zunehmen, daß Dehydro-iso-androsteron im Körper mit intakten Gonaden zur Synthese des Testosterons herangezogen wird. Seine Metaboliten, Androsteron und Ätiocholanolon, scheinen deshalb unter normalen Verhältnissen vermehrt im Urin. Beim Lebercirrhotiker ist aber gerade dieser Abbau gestört und dadurch die Differenz der 17-Ketosteroide erklärt. So können wir uns also die Synthese zu Testosteron in den Gonaden und deren Abbau im Leberparenchym nach dem Schema auf Seite 21 vorstellen.

Der Weg des Dehydro-iso-androsterons über das Testosteron würde somit die Differenz in der Ausscheidung zwischen Normalen und Cirrhotikern verursachen. Unsere Versuchsserie ist allerdings nur klein, weitere Untersuchungen sind zu einer sicheren Abklärung notwendig.

4. Polyarthrititis

In letzter Zeit haben wir im Zusammenhang mit der modernen Cortison-Behandlung auch bei Patienten mit akuten und chronischen Polyarthritiden die 17-Ketosteroide im Urin bestimmt. In Tabelle 6 sind die bis jetzt bei Polyarthritikern gefundenen Werte aufgeführt.

Tabelle 6.

Nr., Patient Geschlecht	Alter	17-Ketosteroide	Diagnose
17. F. F. ♂	54	13,7	Polyarthrititis chron.
18. G. R. ♂	46	18,8	Polyarthrititis chron.
19. K. E. ♂	57	10,3	Polyarthrititis chron.
20. R. J. ♂	36	16,9	Polyarthrititis chron.
21. V. E. ♀	52	5,8	Polyarthrititis chron.
22. V. R. ♀	49	8,3	Polyarthrititis chron.
23. W. J. ♀	56	3,1	Polyarthrititis chron.
24. W. L. ♀	60	11,8	Polyarthrititis chron.
25. Z. J. ♀	29	5,8	Polyarthrititis chron.
26. C. E. ♀	64	7,1	Polyarthrititis chron.
27. F. M. ♀	20	10,6	Polyarthrititis chron.
28. H. L. ♀	51	6,1	Polyarthrititis chron.
29. K. E. ♀	53	12,7	Polyarthrititis chron.
30. Z. F. ♂	34	9,1	Polyarthrititis chron.
31. O. M. ♀	56	1,7	Polyarthrititis chron. + Hepatitis

Resultat. Im allgemeinen liegt bei den untersuchten Polyarthritikern die 17-Ketosteroid-Ausscheidung an der unteren Grenze der Norm. Einige Patienten zeigen sogar deutlich verminderte 17-Ketosteroid-Werte.

b) Erhöhte Ausscheidung der 17-Ketosteroide im Urin

I. Cushing-Syndrom

Dieses von *Cushing* erstmals im Jahre 1932 beschriebene Krankheitsbild ist charakterisiert durch eine sich verhältnismäßig rasch entwickelnde

Verfettung im Gesicht (Vollmondgesicht), am Stamm und am Abdomen. Am Knochensystem kommt es zu einer Osteoporose, und in der Folge tritt häufig eine Kyphose, verbunden mit einer Abnahme der Körpergröße, auf. Am Bauch erscheinen hellrote Striae. Der Blutdruck ist erhöht, häufig wird ein Erythrocytenanstieg beobachtet. Dieses Syndrom kann verschiedene Ursachen haben. Es kann durch ein basophiles Adenom der Hypophyse oder durch eine Hyperplasie oder ein Adenom der Nebenniere bedingt sein. Bei diesen Patienten ist eigentlich eine erhöhte Ausscheidung von 17-Ketosteroiden zu erwarten. Wie die Tabelle 7 zeigt, finden wir aber in Fällen von Cushing-Syndrom auch normale Werte.

Tabelle 7.

Nr., Patient, Geschlecht	Alter	17-Ketosteroid Ausschg. mg	Klinik
32. B. E. ♂	20	6	Vollmondgesicht. Adipositas. Rö.: normalgroße Sella. Blutdruck 140/90. Gesamtcholesterin 163 mg%
33. B. M. ♀	31	12,5	Hypertonie 225/130. Polyglobulie. Adipositas
34. R. M. ♀	20	14,7	Seit 1/2 Jahr Gewichtszunahme. Vollmondgesicht. Striae. Hypertonie
35. S. R. ♂	30	20,5	Große Sella. Vollmondgesicht. Striae. Nach der Bestrahlung noch 10,0 mg 17-Ketosteroid
36. I. R. ♂	19	28,8	Vollmondgesicht. Osteoporose. Striae. Hypertonie. Kleines Genitale
37. B. J. ♂	37	26,8	Vollmondgesicht. Hypertonie. Glykosurie

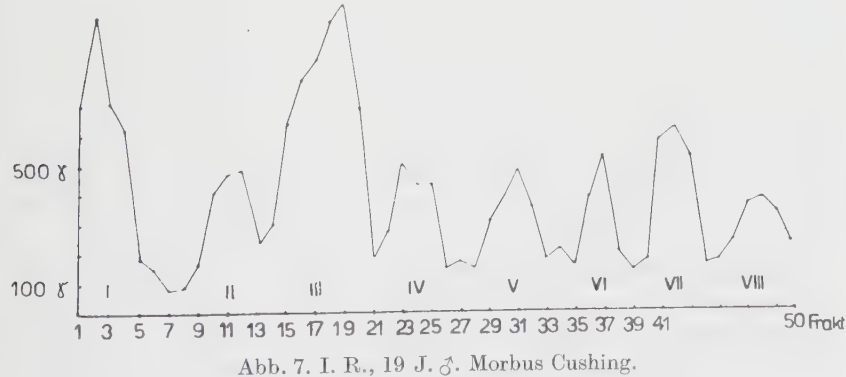


Abb. 7. I. R., 19 J. ♂. Morbus Cushing.
Chromatographische Trennung der 17-Ketosteroide bei einem Fall von Cushing-Syndrom (Fall Nr. 36). – Die Gesamt-17-Ketosteroid-Ausscheidung betrug bei dem Patienten 28,5 mg täglich.

Klinik. Patient zeigte äußerlich das klassische Bild eines Morbus Cushing: kleines Genitale, Polyglobulie, Cholesterinämie, Striae distensae, Stammfettsucht, ausgeprägtes Vollmondgesicht, Pigmentierung der Striae, Osteoporose und Diabetes.

Resultat. Das Chromatogramm zeigt eine vermehrte Ausscheidung von Iso-androstenolon, Dehydro-iso-androsteron, 11-Hydroxy-androsteron und 11-Hydroxy-ätiocholanolon. Androsteron und Ätiocholanolon, nach der gegenwärtigen Auffassung vorwiegend Metaboliten aus den Gonaden, sind relativ vermindert. Diese Diskrepanz zwischen Nebennierenrinden und Gonadenmetaboliten wird von verschiedenen Autoren für das Cushing-Syndrom als charakteristisch bezeichnet. Wir haben es allerdings in keinem der übrigen untersuchten Fälle so deutlich gefunden.

Ein Fall von NNR-Hyperplasie: Interrenalismus oder adreno-genitales Syndrom. – Es handelt sich um eine 11jährige Patientin, deren Urin uns von der Universitätskinderklinik (Direktor: Prof. G. Fanconi) zur Verfügung gestellt wurde.

Klinik. Bis zum 9. Jahr starkes Körperwachstum, seither Sistieren. Starke virile Schambehaarung, Auftreten von leichtem Bartwuchs, Stimmbruch, enges Becken, breite Schultern und völlig unentwickelte Brüste. Ausbleiben der Menses.

Therapeutisch wurde eine der beiden hyperplastischen NNR exstirpiert und später die Hypophyse bestrahlt.

Der Urin der Patientin wurde vor dem Eingriff untersucht.

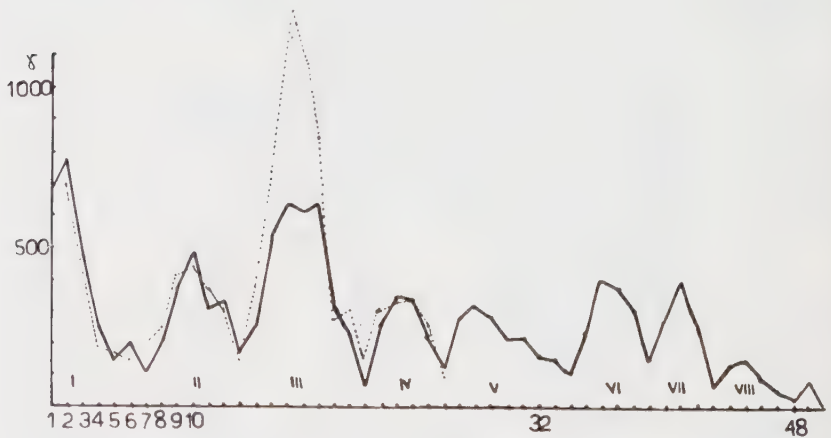


Abb. 8. B. S. ♀. Chromatogramm nach Zusatz von Dehydro-iso-androsteron.

Resultat. Die Gesamt-17-Ketosteroide betrugen 24 mg täglich. Die chromatographische Trennung und Bestimmung ergibt folgendes Bild: starke Erhöhung der Gruppen II-VIII. Sie werden gebildet durch Iso-Androstenolon, Androsteron, Ätiocholanolon, Dehydro-iso-androsteron, 11-Hydroxy-androsteron, 11-Hydroxy-ätiocholanolon. Es ist besonders hervorzuheben, daß auch Iso-Androstenolon deutlich erhöht ist. Es wird gewöhnlich bei normalen Patienten im Urin überhaupt nicht gefunden.

Diskussion unserer Untersuchungen in bezug auf die endokrinologische Diagnostik

Die Bestimmung der 17-Ketosteroide gehört zum unumgänglichen Rüstzeug in der Diagnostik mancher endokriner Krankheitszustände. Die 17-Ketosteroide sind Abbauprodukte der Gonaden- und Nebennierenrinden-Steroide. Ihre Ausscheidung spiegelt somit bis zu einem gewissen Grade die Aktivität dieser Drüsen oder deren übergeordneter Regulationszentren des Hypophysenvorderlappens. Die moderne Endokrinologie und Hormonforschung hat gezeigt, daß die Hypophyse und die Nebennierenrinde an zahlreichen Krankheitsgeschehen, auch außerhalb der eigentlichen endokrinen Störungen beteiligt ist. So konnten wir z. B. in einer früheren Arbeit (*Spühler und Marti*) beim Hypertoniker Zusammenhänge zwischen NaCl-freier Kost und der Ausscheidung der 17-Ketosteroide nachweisen. Wenn wir die Resultate unserer 17-Ketosteroidbestimmungen mit den untersuchten klinischen Bildern vergleichen, können wir bestätigen, daß deren Ausscheidung im Urin ein gutes Kriterium der Funktion der Nebennierenrinde gibt. Eine wesentliche, wenn nicht stets notwendige Vertiefung bringt die chromatographische Analyse, bei welcher verschiedene 17-Ketosteroide getrennt und quantitativ bestimmt werden können. Wohl genügt für die klinische Diagnostik im allgemeinen die Bestimmung der Gesamt-17-Ketosteroide. Bei experimentellen Untersuchungen über den Steroid-Stoffwechsel ist die differenzierende Analyse aber notwendig. Wir haben nachweisen können, daß eine veränderte 17-Ketosteroid-Ausscheidung nicht primär durch eine Dysfunktion der Nebennierenrinde bedingt sein muß, sondern daß sie auch bei gestörter Funktion der Gonaden, der Hypophyse oder höherer Zentren zustande kommen kann. Eine verminderte Ausscheidung durch geänderte Abbauvorgänge müssen wir beim Vorliegen eines Leberschadens annehmen. Wir konnten zeigen, daß z. B. der Testosteronabbau an die Leber gekuppelt ist, die Testosteronbildung aus Dehydroiso-androsteron dagegen an die Gonaden (*Rossier und Marti*). Die stärkste Verminderung der 17-Ketosteroid-Ausscheidung finden wir im allgemeinen beim Morbus Addison. Ebenfalls hochgradig ist die Verminderung bei Lebercirrhose, weniger hingegen bei Kastraten. Bei Polyarthritikern liegt die 17-Ketosteroid-Ausscheidung im Durchschnitt an der untern Grenze der Norm. Eine leichte Vermehrung der 17-Ketosteroide im Urin finden wir beim Vorliegen eines Cushing-Syndroms. Wir unterscheiden heute vorderhand zwischen dem klassischen Morbus Cushing mit dem basophilen Adenom des Hypophysenvorderlappens und dem Cushing-Syndrom, bei dem sich eine Hyperplasie, ein Adenom oder Karzinom der Nebenniere in der klinischen Form eines «Cushing» präsentieren kann. Dies schließt allerdings nicht aus, daß die primäre Störung doch zentral liegt.

Die schon früher beschriebene Diskrepanz in der Ausscheidung zwischen

Gonaden und eigentlichen Nebennierenrinden-Metaboliten haben wir in einem Fall deutlich bestätigen können, es scheint aber, daß die Analyse der 11-Oxysteroiden, wenn sie auch nach neuesten Untersuchungen noch sehr problematisch ist, diagnostisch beim Cushing-Syndrom aufschlußreicher ist.

Andererseits haben ACTH-Versuche, über die wir später in extenso berichten werden, gezeigt, daß die 17-Ketosteroiden im Urin schon bei verhältnismäßig kleiner Dosierung (1mal 25 mg) deutlich mit erhöhter Ausscheidung reagieren.

Zusammenfassend erwies sich die Bestimmung der 17-Ketosteroiden im Urin als eine wertvolle diagnostische Maßnahme in der frühen Diagnose verschiedener endokriner Erkrankungen. Die chromatographische Differenzierung ermöglichte weitere Einblicke in den Um- und Abbau verschiedener Steroide.

Zusammenfassung

Es wird die in einigen Teilen etwas modifizierte Methode zur Trennung und Bestimmung der 17-Ketosteroiden im Urin nach *Dingemanse* und *Huis in't Veld* beschrieben. Die 17-Ketosteroid-Ausscheidung wurde bei verschiedenen endokrinologischen Krankheitsbildern untersucht. Bei Patienten mit Lebercirrhose und zum Vergleich bei normalen Versuchspersonen wurde Testosteron-propionat oder Dehydro-iso-androsteron-acetat i.m. verabreicht. Bei gleicher Testosteron-Applikation stiegen bei den Lebercirrhotikern die 17-Ketosteroiden (wobei besonders Androsteron und Ätiolcholanolon mengenmäßig verfolgt wurden) weniger an als bei normalen Personen. Bei Verabreichung von Dehydro-iso-androsteron-acetat war der Anstieg bei den Cirrhotikern und bei den Normalen gleich. Bei den normalen Personen liegen die Ausscheidungsmengen etwas höher, aber einen sicheren Schluß läßt das kleine Untersuchungsmaterial nicht zu.

Herrn Prof. Dr. *P. H. Rossier* spreche ich für sein wohlwollendes Interesse an dieser Arbeit meinen besten Dank aus.

Besonderer Dank gebührt Herrn P.-D. Dr. *O. Spühler* für die vielen Anregungen und die wertvolle Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.

Frl. Dr. *E. Dingemanse* und Frl. Dr. *L. G. Huis in't Veld* (Laqueur-Institut der Universität Amsterdam) sowie Herrn Prof. Dr. *V. Prelog* (ETH) danke ich herzlich für nützliche Ratschläge.

Herrn Dr. *E. Kühne* und Frl. Dr. *H. Bergmann* verdanken wir die Darstellung analysenreiner Chemikalien.

Frl. *T. Marti*, Laborantin, war eine wertvolle Hilfe bei den Laboratoriumsarbeiten.

Ferner möchten wir allen beteiligten Kliniken danken für das Interesse an dieser Bestimmung und für die Zuweisung endokrinologisch interessanter Fälle.

Die Heparin-Arbeitsgemeinschaft stellte uns in zuvorkommender Weise durch Herrn Prof. Dr. *W. Löffler* ein Spektrophotometer «Beckmann» zur Verfügung.

Burril: Endocrinology (Am.) **31**, 73 (1942). – Butenandt, A. und Tscherning, K.: Z. physiol. Chem. **229**, 185 (1934); **229**, 192 (1934). – Butenandt, A., Dannenbaum, H., Hanisch, G., und Kudzus, H.: Z. physiol. Chem. **237**, 57 (1935). – Callow, N. H., und Callow, R. K.: Biochem. J. (Brit.) **32**, 1759 (1938). – Callow, N. H., Callow, R. K., und Emmens, C. W.: Biochem. J. (Brit.) **32**, 1312 (1938). – Callow, N. H.: Biochem. J. (Brit.) **33**, 931 (1939). – Callow, N. H., und Callow, R. K.: Biochem. J. (Brit.) **33**, 931 (1939). – Callow, N. H., Callow, R. K., Emmens, C. W., und Stroud, S. W.: J. Endocrinol. **1**, 76 (1939). – Callow, N. H., Callow, R. K., und Emmens, C. W.: J. Endocrinol. **2**, 88 (1940). – Danby, M.: Endocrinology (Am.) **27**, 236 (1940). – Dingemans, E., und Laqueur, E.: Biochem. J. (Brit.) **32**, 651 (1938). – Dingemans, E., Huis in't Veld, L. G., und de Laat, B. M.: J. clin. Endocrinol. **6**, 535 (1946). – Dingemans, E., Huis in't Veld, L. G., und Hartogh, L. G.: Nature **161**, 848 (1948). – Dobriner, K., Gordon, E., Rhoads, C. P., Lieberman, S., und Fieser, L. F.: Science **95**, 534 (1942). – Dorfman, R. I., Schiller, S., und Sevringhaus, E. L.: Endocrinology (Am.) **37**, 262 (1945). – Fanconi, G.: Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss. **5**, Fasc. 1, 15 (1949). – Fieser, L. F.: Science **95**, 534 (1942). – Fraser, R. S., Forbes, A. F., Albright, F., Sulkowitch, H., und Reifstein, E.: J. clin. Endocrinol. **1**, 224 (1941). – Gattermann: Praxis des organ. Chemikers, 1946. – Hesse, G.: Adsorptionsmethoden im chem. Laboratorium. Berlin 1943. – Huis in't Veld: Diss. Amsterdam 1948. – Krischesky: Endocrinology (Am.) **32**, 345 (1943). – Luft, R.: Acta med. scand. **115**, 277 (1943); **124**, 277 (1946). – Mason, H. L.: J. biol. Chem. (Am.) **162**, 745 (1946). – Mason, H. L., und Kepler, E. J.: J. biol. Chem. (Am.) **160**, 255 (1945). – Patrono: Ormoni **3**, 705 (1941). – Pearlman, W. H.: Endocrinology (Am.) **30**, 270 (1942). – Polonowski, M.: Les méthodes d'adsorption en biochimie, la chromatographie. Exposé annuel de biochimie médicale. Paris 1939. – Rossier, P. H., und Marti, M.: Acta endocrinol. **6**, 245 (1951). – Ruzicka, L., Goldberg, M. K., Meyer, Brüngger, H., und Eichenberger, E.: Helv. chim. Acta **17**, 1395 (1934); Naturwissenschaften **23**, 46 (1935). – Samuels, L. F., Evans, G. T., und McKelvey, J. L.: Endocrinology (Am.) **32**, 422 (1943). – Sommerville, I. F., Marrian, G. F., Duthie, J. J. R., Sinclair, R. J. G.: Lancet **116** (1950). – Spühler, O., und Marti, M.: Cardiologia **17**, Fasc. 5 (1950). – Talbot, N. B., Ryan, J., Wolfe, J. K.: J. biol. Chem. **148**, 593 (1943). – Venning, E. H., Hoffman, M. M., und Browne, J. S. L.: J. biol. Chem. (Am.) **146**, 369 (1942). – Verzár, F.: Helv. physiol. Acta **1**, 389 (1943). – Verzár, F.: Lehrbuch der inneren Sekretion. Verlag Ars medici, Lüdín AG. Liestal. – Wilson, H., und Carter, P.: Endocrinology (Am.) **41**, 417 (1947). – Zechmeister, L., und v. Cholnoky, L.: Die chromatographische Adsorptionsmethode. Springer, Wien 1938. – Zimmermann, W.: Diss. 1935; Z. physiol. Chem. **245**, 47 (1936).

Curriculum vitae

Am 1. September 1917 wurde ich in Münchenstein (Basseland) geboren. Die Primarschule besuchte ich in MuttENZ und Basel. 1938 erwarb ich am Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Gymnasium in Basel die Maturität. Im Herbst 1938 immatrikulierte ich mich an der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel und nach bestandener Ergänzungsprüfung in Latein auch an der medizinischen Fakultät. Bis 1942 bestand ich das anorganisch-chemische Verbandsexamen und das 1. und 2. propädeutische Examen, 1946 das medizinische Staatsexamen. Das Chemiestudium führte ich bis zum organisch-chemischen Verbandsexamen weiter. Anschließend war ich auf der chirurgischen Abteilung des Kantons-spitals Olten und 7 Monate auf der Röntgenabteilung des Hauptkranken-hauses in Heerlen (Holland) praktisch tätig. Dazu hatte ich auch Gelegenheit am Laqueur-Institut der Universität Amsterdam tätig zu sein. Seit Januar 1948 bin ich Assistent an der medizinischen Poliklinik und seit Mitte 1948 wissenschaftlicher Mitarbeiter von Herrn Prof. *P. H. Rossier* (Direktor der medizinischen Universitätspoliklinik Zürich).

